

心肌骨架分子构型改变与缺血性心肌病

林仲翔

1 前 言

心肌供血不全,心室壁纤维变性,心室僵硬(ventricular stiffness),心律异常等是老年人常见的心脏异常,有关的病理生理和调节机制始终是关注的焦点。心肌细胞骨架肌原纤维的结构分子在基因转录水平的调变,是不容忽视的分子病理学基础,其与老年心脏增龄相关病变的关系更是一个新的尚待探讨的重要问题。肌肉有类似橡皮筋的弹性;静止的肌肉当被动拉长达到肌原纤维肌节内粗丝细丝间重叠消失肌节变长时,同时产生回缩力,即被动张力(passive tension, PT), PT强度可以大于肌肉主动性收缩力的强度。当撤消拉力后,肌肉缩回,恢复静止条件下肌节长度。这种肌肉内在弹力产生机制在很长时间内困扰着人们,直到巨蛋白得到分离后,系列的研究才证明是来源于肌丝成分巨蛋白(titin)^[1]。由于巨蛋白特殊的分子结构和功能,其对个体发育中肌丝结构功能分化及稳定性的保持具有不可忽视的作用,被视为肌节分化的“蓝图分子(molecular blue print)”。巨蛋白是负责肌肉内在弹性的主要元素,有“分子弹簧(molecular spring)”之称。巨蛋白分子功能研究进展丰富了现代对心脏收缩调节和舒张弹性模式的认识,并发现其与心肌缺血性疾病的发展有密切关系^[2-4]。

2 巨蛋白是肌原纤维的第三大类纤维成分

肌肉细胞的肌原纤维是特化了的微丝骨架系统,由肌专一型(sarcomeric)微丝蛋白 actin 和微丝相关蛋白 myosin, α -actinin, tropomyosin, troponin 等组成。心肌和骨骼肌同属于横纹肌,有相同的基本结构,都是由许多肌肉细胞(肌纤维)组成,肌纤维长 1~40 mm,内充满肌原纤维(myofibrils),贯穿整个肌纤

维的长轴,是肌肉收缩力量的发动器,即收缩器(contractile apparatus)。肌原纤维由明暗交替的带前后相间贯穿纤维全长,在光学显微镜下呈现横纹。暗带又称 A 带,明带又称 I 带。A 带中央有暗的 H 区将其平分,I 带中央有暗的 Z 盘(或称 Z 线,因为在电镜下呈现 Z 样轮廓)将其平分。由 Z 盘到相邻 Z 盘的段落称为一个肌节,它含有一个完整 A 带和两个 1/2 I 带。肌节既是肌原纤维的结构单元又是功能单元,组成肌节的蛋白质约 30 种以上,相互间存在复杂的结合关系和相互作用,但是从低等脊椎动物到人的肌节,在静止状态时的长度是恒定的,约为 2 μ m。肌节对收缩信号的反应敏捷而精确,因此成为机体内最精细的结构之一。早期研究证明肌丝蛋白质中,除了辅助性蛋白质外,主要含有两类原丝,即 A 带粗丝(thick filaments)和 I 带细丝(thin filaments)。粗丝由 II 型肌球蛋白(myosin II)组成,细丝含肌动蛋白(actin),二者是公认的肌丝主要结构成分和负责收缩功能的两大纤维体系。巨蛋白和鬃蛋白(nebulin)由于巨大分子量特点,较晚分离和纯化,组成肌丝的第三大纤维体系,对肌节结构的分化和弹力功能十分重要,参与收缩功能的调控。巨蛋白是至今所知动物体内最大的蛋白质分子,Mr 约 3×10^6 ,为直线形多肽分子,沿肌节长轴分布长达 1 μ m,跨越半个肌节的 A-I-Z 带区,一端连接 A 带粗丝 myosin 分子尾部(M-带),另一端连接 Z 盘的 α -actin/ α -actinin,为肌节各带的蛋白质提供专一性和空间规范性的分子连接位点,架桥于 I 带和 A 带之间,有效地贯穿 Z 盘到 M 带的半个肌节,因此是能以单个分子代表半肌节样品的唯一蛋白质,有可能将空间的,和时间的信息传递到肌节长距离内的其它蛋白质分子^[1,5,6]。巨蛋白分子由 280 多个 Ig-和 FN₃ 样结构域及 Z 盘专一序列组成,是具有模块结构特征(modular fashion)的分子,其生理功能主要是在粗丝-细丝间起着弹性连接的作用。巨蛋白分子的 I 带区序列有弹力特性,该序列将 Ig-模块与富含 proline, glutamate, valine, lysine 的 PEVK 区一前一后地分割开,PEVK 区是巨蛋白弹性序列区弹簧性结构的基

收稿日期:2004-12-14

基金项目:“973”基金资助(G2000057002)

作者单位:100034 北京市,北京大学临床肿瘤学院暨北京市肿瘤研究所细胞生物室

作者简介:林仲翔,女,1931年12月生,山东省莱阳市人。医学博士,教授。Tel:010-66135079

基础^[1]。心肌巨蛋白分子的弹力序列区称为 N2B, 随哺乳类胚胎心肌发育在出生前后阶段出现两种 RNA 拼接差异的构型, 各具有不同特性, N2B 弹力序列较短而僵硬, N2BA 弹力序列则较长而富弹性^[4]。两种构型在各种系成体心肌中同时表达, 并保持恒定比值。此外还证明人类心肌巨蛋白分子的 M 带区含有激酶活性序列。以上发现促使对巨蛋白在心肌收缩调节中作用的认识不断深化。巨蛋白分子对心脏主动收缩和被动收缩都具有的不可忽视的作用, 特别在对心室的舒张压、心率的调节方面巨蛋白分子构型的影响使该分子与心肌疾病关系问题受到密切关注^[2,3](图 1,2)。

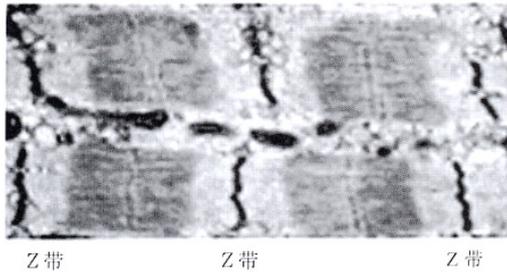


图 1 横纹肌肌节结构(电镜照片)

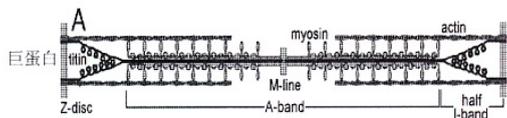


图 2 巨蛋白分子序列示意图^[3]

3 巨蛋白驱动的心肌纤维被动收缩

激活条件下的心肌纤维收缩是主动性的, 收缩时肌节缩短到其静止期长度的约 70%。哺乳类心肌的缩短速度受许多因素影响, 其中最受关注的有 actin-myosin 交叉桥和被动性结构, 如心肌细胞外基质成分的作用。随着巨蛋白分子功能特性的不断揭示, 对肌节收缩机械功能的模式认识有所更新。最近新技术如原子力学显微测量法及分子细胞生理学等的利用综合研究证明^[3]: 巨蛋白在肌节被拉长时产生被动回缩力 (passive force), 又可以在心肌主动收缩时维持肌节位置的稳定; 肌肉内在的黏性/黏弹性与巨蛋白有关, 对肌肉收缩调节很重要; 巨蛋白的分子弹簧特性使之可以适应肌肉收缩的特殊需要来调节其分子机械特性。这些证据一致提示巨蛋白对心肌纤维被动收缩的主导作用。实验资料表明, 心

脏在舒张时的被动性张力 PT 处于较高水平; 左心室于充盈末期舒张容积可达到极限, 此时心肌肌节长度增长至 2.2 ~ 2.3 μm , 被动张力 PT 强度 (mN/mm^2) 可达 10 位级。又证明肌节长度在生理极限长度时的心肌 PT 决定于两个主要元素; 即以胶原蛋白 (collagen) 为主的细胞外基质 (ECM) 成分和肌原纤维成分巨蛋白。另外的测定资料提出巨蛋白驱动的 PT 强度在生理条件下为 4 pN/分子 (force/titin molecule), 说明心肌肌节在巨蛋白弹簧松弛时能够弹力回缩。巨蛋白所具有的这种分子弹力回缩机械特性能够影响收缩期心脏心肌纤维的缩短速度, 其在心脏功能调节中的作用不容忽视。过去的研究就曾指出, 心肌纤维的主动缩短速度可以受到诸多负性因素的拮抗; 一方面细胞骨架和细胞外基质 ECM 可能对收缩器施加负荷从而拮抗肌丝缩短的速度, 另一方面肌丝巨蛋白有阻尼作用加强了对抗主动收缩的力度。当静止的心肌肌原纤维被突然拉长时, 除产生回缩力外, 还产生黏性/黏弹性作用力 (viscous/viscoelastic forces), 后者主要来自巨蛋白与 actin 分子间微弱相互作用的阻尼力, 似乎二者共同决定着心肌的缩短行为。Opitze 等^[3]用人类离体心肌的新证据说明肌原纤维巨蛋白分子弹簧的弹性回缩力受到的阻尼来源于肌丝内巨蛋白与 actin 分子间相互作用, 所产生的黏滞力可以拮抗被动性弹性回缩力 PT。人心肌肌原纤维的 PT 相对较低, 但其缩短速度 (V_p) 在初期却非常高, 远超过钙离子活化的肌纤维主动性收缩缩短速度 (V_0)。由于巨蛋白与 actin 间相互作用, 起到衰减 V_p 的结果, 使之在 $< 10 \text{ ms}$ 内力度水平降低到明显低于 V_0 。因此巨蛋白与 actin 间相互作用对肌原纤维的主动回缩同样有调节作用。在正常健康心脏, 巨蛋白如何调节心肌肌节缩短速度的机制有待阐明。

4 巨蛋白分子弹簧序列构型与心室壁僵硬及缺血性心脏病

心肌细胞内巨蛋白纤维的弹簧特性与心脏细胞外基质胶原蛋白的负性拮抗作用共同调节心脏收缩过程的心室僵硬, 是影响心脏舒张功能的主要因素。心室壁僵硬增加是与心室壁顺应性相反的改变, 往往出现在慢性缺血性心脏病过程。正常心肌细胞外基质的胶原蛋白网架主要成分为 I 型和 III 型胶原, 两种亚型表达水平呈恒定比值, 形成的胶原网架能使不同细胞成分和非细胞成分保持有序定位, 对心脏组织机械特性的维持十分重要。在特定的生

理条件下胶原骨架能够有限地调节心室舒张僵硬度和肌节长度,胶原网架的胶原纤维如同波浪形索条,可阻止肌节过度伸长避免超过 $2.3 \mu\text{m}$,从而提供了为保持心肌细胞侧位排列稳定的支架。在缺血性心脏病常见到胶原蛋白表达上调,增多的胶原蛋白会引起被动张力增高和心肌僵硬,左心室壁僵硬增加。值得注意的是胶原蛋白表达量的改变常伴随着分子构型转换及排列改变^[7]。后来发现心肌细胞内的巨蛋白对左心室壁僵硬有着重要影响;左心室壁僵硬改变,主要还是由于巨蛋白改变所致。巨蛋白的含量占心肌总蛋白的 10%,仅次于肌球蛋白(40%)和肌动蛋白(22%)。作为一个分子,它分布从 Z 线到 M 带,不仅是保持肌节结构整体性所不能缺少的,而且在进化过程中适应心肌功能的特殊需要而发生转录拼接变异产生了不同的分子构型,即 N2B, N2BA。已为 Opitz 等^[3]的实验资料证明,正常人心肌肌节含有 N2BA 与 N2B 两种巨蛋白构型,二者表达水平呈恒定比值,已经为电泳分析或免疫荧光细胞化学结果确定,约为 28:72。在起搏诱发心动过速动物(狗)模型的实验证明, N2BA/N2B 比值升高,说明 N2BA 亚型巨蛋白表达增高的改变能使心肌细胞的被动性僵硬下降或顺应性升高,与易于发作室性心动过速有关^[8,9]。来自 Neagoe 等^[2]人类心脏组织研究材料,正常的人心肌同时表达两种巨蛋白亚型 N2BA 和 N2B 的比值恒定在 30%,与前面的正常心肌结果相一致。然而严重冠心病心脏的巨蛋白构型分析发现 N2BA 亚型表达增强。冠心病心肌凝胶电泳分析及免疫印迹分析 N2BA 含量平均为 $(47.0 \pm 2.4)\%$,明显高于不缺血性的正常心肌对照($P < 0.002$)。严重冠心病心肌的总巨蛋白含量(N2B + N2BA)与正常对照组相比无显著性差别($P > 0.05$),说明以上改变是由于冠心病心肌巨蛋白构型向 N2BA 转换所致,导致左心室僵硬减弱,顺应性提高,合并整个心脏的左室终末舒张压(LVEDP)的极度升高,最后结局为心衰。看来在长时期的心脏缺血发展为严重的充血性心力衰竭过程中,巨蛋白分子构型表达比值的改变结果使肌原纤维更柔顺,是心衰发展的一个重要因素。被动张力检测发现冠心病僵硬心脏含有更多顺应性心肌纤维,正常人 2 例心脏 LVEDP 测定为 7~12 mmHg,心肌巨蛋白分析含低百分比的 N2BA 亚型。冠心病病人 2 例,心脏测定 LVEDP 分别为 32 和 25 mmHg,异常增高,心肌纤维巨蛋白分析含高百分比的 N2BA 亚型。静止的人心肌纤维被动张力检测实验中,所

有检测材料在舒张缓冲液内松弛,肌节长度均为 $1.85 \sim 1.9 \mu\text{m}$ 。在逐步拉长肌节时,正常人肌节长度在 $2.1 \sim 2.4 \mu\text{m}$ 范围内 PT 升高,冠心病人心肌 PT 则显示持续态下降。说明冠心病人心肌 N2BA/N2B 比值增加和心肌纤维 PT 下降相关。由于巨蛋白构型转换所致心肌顺应性提高,可能是冠心病心脏在慢性缺血性心衰发展过程中,心肌对抗因胶原纤维增多,心脏预负荷慢性增加所致的心脏总体性僵硬升高的一种代偿性机制。动物实验大鼠心脏慢性缺血性心衰模型也证明,心肌巨蛋白 N2BA 亚型阳性的动物占 43%,而模拟手术对照组 N2BA 阳性率只占 14%。正常生理条件下大鼠心脏巨蛋白 N2BA 亚型表达水平低,几乎测不出,在心衰发病后 12~24 周,巨蛋白 N2BA 构型持续升高。巨蛋白可能参与心脏的代偿机制,在心脏的 Frank-Starling 机制中发挥作用。该分子可能是感受肌节长度变化的结构元素,影响肌原纤维 Ca^{2+} 敏感性的改变。如果由于巨蛋白构型改变导致肌原纤维的张力改变,就很可能成为影响肌纤维 Frank-Starling 定律发挥作用的分子基础。进一步设想,这可能导致在心衰发生过程中心脏收缩功能的下降,是值得跟踪研究的问题。

5 小 结

巨蛋白是肌丝原纤维成分中的关键元素,是正常或疾病心肌中负责被动性和主动性机械收缩特性的分子之一。巨蛋白驱动的心肌纤维被动性收缩对心肌功能有重要意义,对于促进人心肌在开始收缩时的主动收缩速度十分重要;其与肌动蛋白分子间黏滞力又能使收缩末期的心肌放慢其主动收缩以防止在心肌肌节长度缩短条件下 A 带碰上 Z 带。慢性缺血心脏病人心脏心肌的巨蛋白分子弹力区构型转换, N2BA 比值升高。这一构型转换在大鼠心肌梗死模型心脏得到确认,它导致由巨蛋白操纵的肌原纤维僵硬下降。巨蛋白分子弹力区构型 N2BA 比值升高可削弱心肌细胞的负性黏滞力,从而易发作心动过速。在长期性缺血心脏则会由于这种改变损伤心脏的 Frank-Starling 机制的发挥。以上提示巨蛋白的损伤或表达改变对于心脏机械收缩功能有着深远的影响,从人的心肌材料得到的研究结果是很新的资料,还需要更多研究印证和积累;不同实验室资料也肯定了冠心病有心肌巨蛋白亚型转换,但比值不相同^[7,9],说明情况是复杂的。总之,从巨蛋白对心脏心室功能的影响来看,对临床和基础心脏病

学提出的启示,值得我们在实践中深入探讨和利用。

参考文献

- 1 Gautel M, Mues A, Young P. Control of sarcomeric assembly: the flow of information on titin. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 1999, 138:98-126.
- 2 Neagoe C, Kulke M, Monte F, et al. Titin isoform switch in ischemic human heart disease. *Circulation*, 2002, 106: 1333-1341.
- 3 Opitz CA, Kulke M, Leake MC, et al. Damped elastic recoil of the titin spring in myofibrils of human myocardium. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 12688 -12693.
- 4 Opitz CA, Leake MC, Makarenko I, et al. Developmentally regulated switching of titin size alters myofibrillar stiffness in the perinatal heart. *Circ Res*, 2004, 94: 967-975.

- 5 Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. *Molecular cell biology*, 4th ed, New York: W. H. Freeman and Company, 2000. 774-779.
- 6 Ojima K, Lin ZX, Bang ML, et al. Distinct families of Z-line targeting molecules in the COOH-terminal region of nebulin. *J Cell Biol*, 2000, 150: 553-566.
- 7 Hein S, Gasch WH, Schaper J. Giant molecule titin and myocardial stiffness. *Circulation*, 2002, 106:1302-1310.
- 8 Bell SP, Nyland L, Tischler MD, et al. Alterations in the determinants of diastolic suction during pacing tachycardia. *Circ Res*, 2000, 87: 235-240.
- 9 Wu Y, Bell SP, Trombitas K, et al. Changes in titin isoform expression in pacing failure give rise to increased passive muscle stiffness. *Circulation*, 2002, 106: 1384.

(上接第 129 页)

切关系这一事实,对心房肌袖结构的增龄性(或老化)改变与房颤发生发展的关系研究更显重要。明确老年房颤是心房、肺静脉肌袖解剖结构的病理生理改变,还是单纯性生理性退行性改变所致,将对房颤的防治研究产生重要的影响。

作为增龄对心房肌袖组织学及电生理学特性影响系列研究的一部分,本课题主要通过两组正常的、不同年龄段犬的心房和肺静脉肌袖整体电生理特征进行对比研究。结果显示老龄犬的心房,上腔静脉,冠状静脉窦和肺静脉的有效不应期较成年犬均有不同程度的缩短,其中左心房,上腔静脉和肺静脉有效不应期的随龄性变化更明显。老龄犬的肺静脉和上腔静脉内激动传导呈显著递减性传导。在老龄犬的肺静脉、左心房和上腔静脉等部位,快速短阵起搏或程序刺激能诱发房颤,而在健康成年犬,不使用药物,即使提高刺激阈值或刺激频率,也不能诱发房颤。动物实验结果表明:老化的肺静脉肌袖所表现出的电生理变化易于房颤的发生。但上述研究只表明老化为异位兴奋的折返和传导创造了条件,仍未说明老化与异位激动形成的关系。进一步的研究有待于在肌袖组织细胞离子通道和连接蛋白方面的突破。

参考文献

- 1 Furberg CD, Psaty BM, Manolio TA, et al. Prevalence of atrial

fibrillation in elderly subjects. *Am J Cardiol*, 1994, 74:236-241.

- 2 Benjamin EJ, Levy D, Vaziri SM, et al. Independent risk factors for atrial fibrillation in a population-based cohort. The Framingham Heart Study. *JAMA*, 1994, 271: 840-844.
- 3 Hancox JC, Patel KCR, Jones JV. Antiarrhythmics—from cell to clinic: past, present, and future. *Heart*, 2000, 84: 14-24.
- 4 Tagawa M, Higuchi K, Chinushi M, et al. Myocardium extending from the left atrium onto the pulmonary veins: a comparison between subjects with and without atrial fibrillation. *Pacing Clin Electrophysiol*, 2001, 24: 1459-1463.
- 5 Verheule S, Wilson EE, Arora R, et al. Tissue structure and connexion expression of canine pulmonary veins. *Cardiovasc Res*, 2002, 55: 727-738.
- 6 Tada H, Oral H, Ozaydin M, et al. Response of pulmonary vein potentials to premature stimulation. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2002, 13:33-37.
- 7 Cheung DW. Electrical activity of the pulmonary vein and its interaction with the right atrium in the guinea pig. *J Physiol*, 1981, 314:445-456.
- 8 Blom NA, Groot ACG, DeRuiter ML, et al. Development of the cardiac conduction tissue in human embryos using antigen expression. *Circulation*, 1999, 99:800-812.
- 9 Winfree AT. Spiral waves of chemical activity. *Science*, 1977, 175:634-636.
- 10 Ho SY, Cabrera JA, Tran VH, et al. Architecture of the pulmonary veins: relevance to radiofrequency ablation. *Heart*, 2001, 86:265-270.